

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 41 38 042 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 41 38 042.8
㉔ Anmeldetag: 19. 11. 91
㉕ Offenlegungstag: 27. 5. 93

㉙ Int. Cl.⁵:
C 07 D 493/04
C 12 P 17/18
A 01 N 43/90
A 01 N 63/02
C 07 G 11/00
A 61 K 31/425
// (C07D 493/04,
303:00)C07D 313:00,
277:24 (C12P 17/18,
C12R 1:01)

DE 41 38 042 A 1

㉙ Anmelder:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

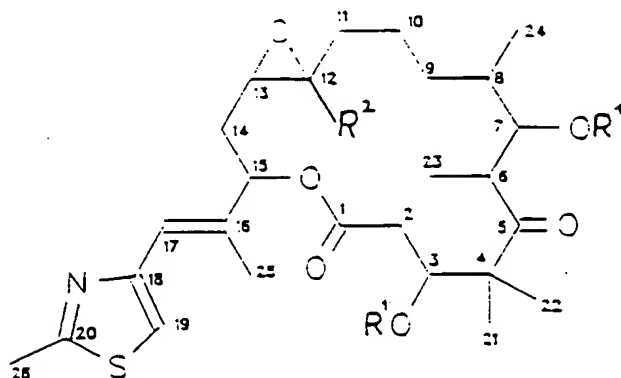
㉚ Vertreter:
Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

㉛ Erfinder:
Höfle, Gerhard, Prof. Dr.; Bedorf, Norbert, Dr.;
Gerth, Klaus, Dr.; Reichenbach, Hans, Prof. Dr., 3300
Braunschweig, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉜ Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel

㉝ Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemei-
nen Formel

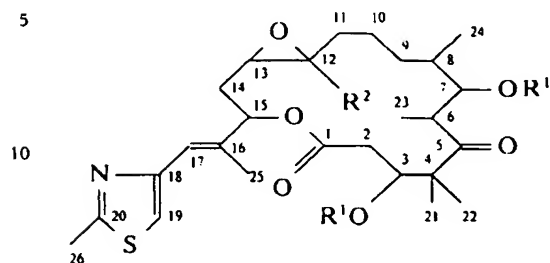


Herstellungsverfahren sowie Epothilone enthaltende Mittel.

DE 41 38 042 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff, C₁–C₄-Alkyl, C₁–C₄-Acyl, Li⁺, K⁺, Na⁺, 1/2 Mg²⁺ oder 1/2 Ca²⁺ bedeutet und R² Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung eine Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H–NMR-Daten Atom		¹³ C–NMR-Daten Atom	
2a	2,4	1	170,5
2b	2,52	2	39,1
3	4,19	3	73,2
6	3,2	4	53,0
7	3,78	5	219,9
8	1,73	6	43,5
9a	1,4	7	74,7
9b	1,52	8	36,4
10a	1,4	9	30,7
10b	1,4	10	23,6
11a	1,42	11	27,6
11b	1,7	12	57,4
12	2,9	13	54,6
13	3,01	14	31,7
14a	1,85	15	76,8
14b	2,11	16	137,4
15	5,41	17	120,1
17	6,6	18	152,1
19	6,99	19	116,3
21*)	1,08	20	165,0
22*)	1,35	21*)	20,4
23	1,15	22*)	21,6
24	0,93	23	14,1
25	2,05	24	17,1
26	2,69	25	15,6
		26	19,1

*) Zuordnung vertauschbar.

C₂₆H₃₉NO₆S[493]

FAB-MS (neg. Ionen): 429.25 für (M-H)[–]

UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{–1}

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 1

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanilin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 5,4 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;
 Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35
 Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H-NMR-Daten		¹³ C-NMR-Daten	
Atom		Atom	
2a	2,22 dd	1	170,5
2b	2,53 dd	2	39,4
3	4,24 dd	3	72,9
6	3,28 m	4	53,2
7	3,75 dd	5	219,8
8	1,73 m	6	43,1
9a	1,4 m	7	74,3
9b	1,5 m	8	36,6
10a	1,4 m	9	30,9
10b	1,4 m	10	22,5
11a	1,42 m	11	32,3
11b	1,7 m	12	61,3
12	—	13	61,7
13	2,8 dd	14	32,4
14a	1,9 ddd	15	76,9
14b	2,1 ddd	16	137,5
15	5,41 dd	17	120,0
17	6,6 s	18	152,1
19	6,99 s	19	116,2
21*)	1,05 s	20	165,1
22*)	1,36 s	21*)	19,7
23	1,15 d	22*)	21,5
24	0,92 d	23	13,7
25	2,05 s	24	17,1
26	2,69 s	25	15,7
27	1,28 s	26	19,0
		27	22,7

(R¹ = CH₃)

*) Zuordnung vertauschbar

C₂₇H₄₁NO₆S[507]
 FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M-H)⁻
 UV (MeOH)λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

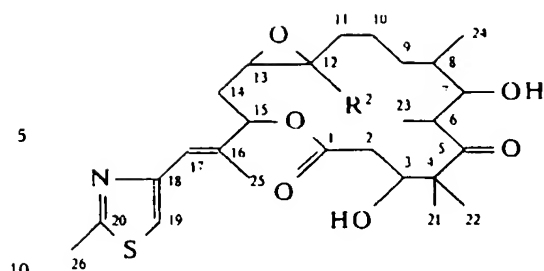
IR Film auf Irtran:
 ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm⁻¹

DC: R_F = 0,75
 DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:
 Dichlormethan/Methanol = 90 : 10
 Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm
2. Ansprühen mit Vanilin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6,3 min
 Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;
 Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35
 Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel



worin R_2 Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreingt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z. B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

Produktionsstamm

Stamm So ce90 wurde im Juli 1985 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, Südafrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) unter Nr. 6773 hinterlegt.

Stammkultur und morphologische Beschreibung: Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit KNO_3 als einzige Stickstoffquelle, z. B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagar (0.1% KNO_3 ; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.1% K_2HPO_4 ; 0.01% $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.02% FeCl_3 ; 0.002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sprangiolen (etwa 15 bis 30 μm Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und KNO_3 , z. B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1.5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7.5% KNO_3 , 7.5% K_2HPO_4 in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1.5% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0.2% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.15% FeCl_3 in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest. Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3, sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung).

Die vegetativen Stäbchen haben für Sorangium typischen Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3–6 μm lang und 1 μm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z. B. die Hemmung von *Mucor hiemalis*.

Produktion der biologisch aktiven Verbindungen

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert.

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 60 l Medium (0.8% Stärke; 0.2% Glucose; 0.2% Sojamehl; 0.2% Hefeextrakt; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7.4) gefüllt. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 upm, 30°C). Fermentiert wird bei 32°C mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0.2 NL pro m^3 und Std., der pH-Wert wird durch Zugabe von KOH bei

7.4 gehalten. Die Fermentation dauert 7–10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Überstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z. B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2–5%) fermentiert werden.

Isolierung von Epothilon A und B

Während der Fermentation von *Sorangium cellulosum* So ce90 (z. B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z. B.: XAD-1180, Röhm und Haas, 2% v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A (Abb. 1) und B (Abb. 2) vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrühe (z. B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingeeengt und dreimal mit je 0,2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingeeengt (ca. 40 g Trockengewicht).

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep RP-18 25–40 µm (Säule: 400 × 100 mm; Fluß: 200 ml/min; Merck Prepbar) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen (R_t ca. 95–125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 × 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min; R_t Epothilon A: 140–165 min; R_t Epothilon B: 170–195 min.

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2
2. Epothilon B: Ethylacetat

Epothilon A

$C_{26}H_{39}NO_6S$ [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 429.25 für $(M-H)^-$

1H —NMR-Daten s. Tab. 1

^{13}C —NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1}

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 5,4 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Epothilon B

$C_{27}H_{41}NO_6S$ [507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für $(M-H)^-$

1H —NMR-Daten s. Tab. 1

^{13}C —NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm^{-1}

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6,3 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Tabelle 1

¹H – NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A	B
2a	2,4 dd	2,22 dd
2b	2,52 dd	2,53 dd
3	4,19 dd	4,24 dd
6	3,2 m	3,28 m
7	3,78 dd	3,75 dd
8	1,73 m	1,73 m
9a	1,4 m	1,4 m
9b	1,52 m	1,5 m
10a	1,4 m	1,4 m
10b	1,4 m	1,4 m
11a	1,42 m	1,42 m
11b	1,7 m	1,7 m
12	2,9 ddd	—
13	3,01 ddd	2,8 dd
14a	1,85 ddd	1,9 ddd
14b	2,11 ddd	2,1 ddd
15	5,41 dd	5,41 dd
17	6,6 s	6,6 s
19	6,99 s	6,99 s
21*)	1,08 s	1,05 s
22*)	1,35 s	1,36 s
23	1,15 d	1,15 d
24	0,93 d	0,92 d
25	2,05 s	2,05 s
26	2,69 s	2,69 s
27	—	1,28 s

*) Zuordnung vertauschbar

Tabelle 2

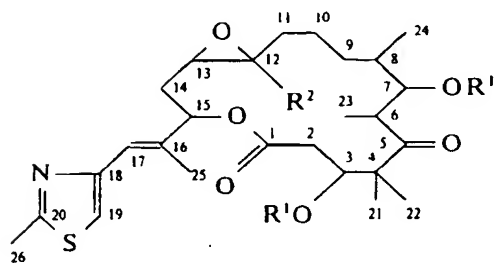
 ^{13}C -NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A	B
1	170,5	170,5
2	39,1	39,4
3	73,2	72,9
4	53,0	53,2
5	219,9	219,8
6	43,5	43,1
7	74,7	74,3
8	36,4	36,6
9	30,7	30,9
10	23,6	22,5
11	27,6	32,3
12	57,4	61,3
13	54,6	61,7
14	31,7	32,4
15	76,8	76,9
16	137,4	137,5
17	120,1	120,0
18	152,1	152,1
19	116,3	116,2
20	165,0	165,1
21*)	20,4	19,7
22*)	21,6	21,5
23	14,1	13,7
24	17,1	17,1
25	15,6	15,7
26	19,1	19,0
27	—	22,7

*) Zuordnung vertauschbar

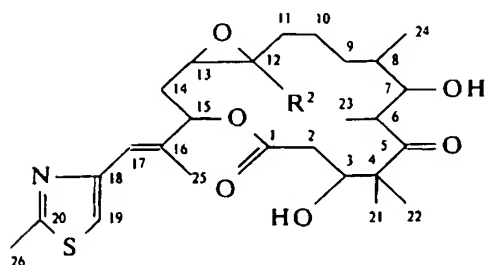
Patentansprüche

1. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff, C₁–C₄-Alkyl, C₁–C₄-Acyl, Li⁺, K⁺, Na⁺, 1/2 Mg²⁺ oder 1/2 Ca²⁺ bedeutet und R² Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

2. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R² Wasserstoff oder Methyl ist.

3. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H-NMR-Daten Atom		¹³ C-NMR-Daten Atom	
2a	2,4	1	170,5
2b	2,52	2	39,1
3	4,19	3	73,2
6	3,2	4	53,0
7	3,78	5	219,9
8	1,73	6	43,5
9a	1,4	7	74,7
9b	1,52	8	36,4
10a	1,4	9	30,7
10b	1,4	10	23,6
11a	1,42	11	27,6
11b	1,7	12	57,4
12	2,9	13	54,6
13	3,01	14	31,7
14a	1,85	15	76,8
14b	2,11	16	137,4
15	5,41	17	120,1
17	6,6	18	152,1
19	6,99	19	116,3
21*)	1,08	20	165,0
22*)	1,35	21*)	20,4
23	1,15	22*)	21,6
24	0,93	23	14,1
25	2,05	24	17,1
26	2,69	25	15,6
		26	19,1

*) Zuordnung vertauschbar.

C26H39NO6S[493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm^{-1}

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanilin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 5,4 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

4. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H—NMR-Daten		¹³ C—NMR-Daten		
Atom		Atom		
2a	2,22 dd	1	170,5	5
2b	2,53 dd	2	39,4	
3	4,24 dd	3	72,9	
6	3,28 m	4	53,2	
7	3,75 dd	5	219,8	
8	1,73 m	6	43,1	10
9a	1,4 m	7	74,3	
9b	1,5 m	8	36,6	
10a	1,4 m	9	30,9	
10b	1,4 m	10	22,5	
11a	1,42 m	11	32,3	15
11b	1,7 m	12	61,3	
12	—	13	61,7	
13	2,8 dd	14	32,4	
14a	1,9 ddd	15	76,9	
14b	2,1 ddd	16	137,5	20
15	5,41 dd	17	120,0	
17	6,6 s	18	152,1	
19	6,99 s	19	116,2	
21*)	1,05 s	20	165,1	
22*)	1,36 s	21*)	19,7	25
23	1,15 d	22*)	21,5	
24	0,92 d	23	13,7	
25	2,05 s	24	17,1	
26	2,69 s	25	15,7	
27	1,28 s	26	19,0	30
		27	22,7	

(R¹ = CH₃)

*) Zuordnung vertauschbar

C₂₇H₄₁NO₆S[507]FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M-H)⁻UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm⁻¹DC: R_F = 0,75DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanilin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6,3 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 μm, Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

5. Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Stamm So ce90

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,

— die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und

— die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,

— und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinholt und voneinander trennt.

6. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fungizid oder Fungistatikum ist.

8. Therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder diese Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 41 38 042 C 2**

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 07 D 493/04

C 12 P 17/18
A 01 N 43/90
A 01 N 63/02
C 07 G 11/00
A 61 K 31/425

②1 Aktenzeichen: P 41 38 042.8-44
②2 Anmeldetag: 19. 11. 91
④3 Offenlegungstag: 27. 5. 93
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 14. 10. 93

DE 41 38 042 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

⑦4 Vertreter:
Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 81541 München

⑦2 Erfinder:
Höfle, Gerhard, Prof. Dr., 3300 Braunschweig, DE;
Bedorf, Norbert, Dr., 3300 Braunschweig, DE; Gerth,
Klaus, Dr., 3300 Braunschweig, DE; Reichenbach,
Hans, Prof. Dr., 3300 Braunschweig, DE

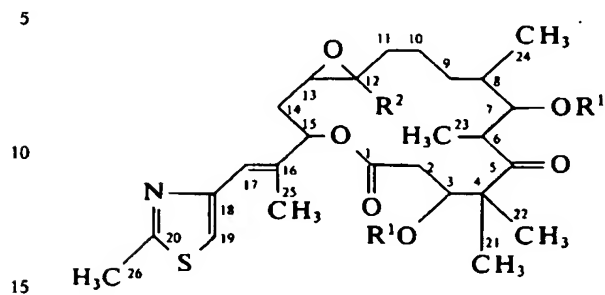
⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
NICHTS ERMITTELT

⑤4 Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie diese Verbindungen enthaltende Mittel

DE 41 38 042 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff, C₁- bis C₄-Alkyl, C₁- bis C₄-Acyl, Li⁺, K⁺, Na⁺, 1/2 Mg²⁺ oder 1/2 Ca²⁺ bedeutet und R² Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H-NMR-Daten Atom		¹³ C-NMR-Daten Atom	
2a	2,4	1	170,5
2b	2,52	2	39,1
3	4,19	3	73,2
6	3,2	4	53,0
7	3,78	5	219,9
8	1,73	6	43,5
9a	1,4	7	74,7
9b	1,52	8	36,4
10a	1,4	9	30,7
10b	1,4	10	23,6
11a	1,42	11	27,6
11b	1,7	12	57,4
12	2,9	13	54,6
13	3,01	14	31,7
14a	1,85	15	76,8
14b	2,11	16	137,4
15	5,41	17	120,1
17	6,6	18	152,1
19	6,99	19	116,3
21*)	1,08	20	165,0
22*)	1,35	21*)	20,4
23	1,15	22*)	21,6
24	0,93	23	14,1
25	2,05	24	17,1
26	2,69	25	15,6
		26	19,1

*) Zuordnung vertauschbar,

C₂₆H₃₉NO₆S[493]

FAB-MS (neg. Ionen): 429.25 für (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

v: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm⁻¹

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: $R_t = 5,4$ min

Säule: 4×250 mm Lichrosorb® RP-18 7 μ m;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H—NMR-Daten		¹³ C—NMR-Daten	
Atom		Atom	
2a	2,22 dd	1	170,5
2b	2,53 dd	2	39,4
3	4,24 dd	3	72,9
6	3,28 m	4	53,2
7	3,75 dd	5	219,8
8	1,73 m	6	43,1
9a	1,4 m	7	74,3
9b	1,5 m	8	36,6
10a	1,4 m	9	30,9
10b	1,4 m	10	22,5
11a	1,42 m	11	32,3
11b	1,7 m	12	61,3
12	—	13	61,7
13	2,8 dd	14	32,4
14a	1,9 ddd	15	76,9
14b	2,1 ddd	16	137,5
15	5,41 dd	17	120,0
17	6,6 s	18	152,1
19	6,99 s	19	116,2
21*)	1,05 s	20	165,1
22*)	1,36 s	21*)	19,7
23	1,15 d	22*)	21,5
24	0,92 d	23	13,7
25	2,05 s	24	17,1
26	2,69 s	25	15,7
27	1,28 s	26	19,0
		27	22,7

(R¹ = CH₃)

*) Zuordnung vertauschbar

C₂₇H₄₁NO₆S[507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

$\nu = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977$ cm⁻¹

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

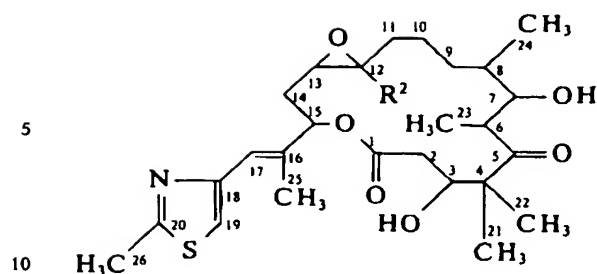
HPLC: R_t = 6,3 min

Säule: 4×250 mm Lichrosorb® RP-18 7 μ m;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel



worin R^2 Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreingt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z. B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, die insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken können, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

Produktionsstamm

Stamm So ce90 wurde im Juli 1985 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, Südafrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) unter Nr. 6773 hinterlegt.

Stammkultur und morphologische Beschreibung: Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit KNO_3 als einzige Stickstoffquelle, z. B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagar (0.1% KNO_3 ; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.1% K_2HPO_4 ; 0.01% $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.02% FeCl_3 ; 0.002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sporangiolen (etwa 15 bis 30 μm Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und KNO_3 , z. B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1.5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7.5% KNO_3 , 7.5% K_2HPO_4 in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1.5% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0.2% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.15% FeCl_3 in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest. Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3, sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung).

Die vegetativen Stäbchen haben die für Sorangium typische Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3–6 μm lang und 1 μm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z. B. die Hemmung von *Mucor hiemalis*.

Produktion der biologisch aktiven Verbindungen

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert.

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 60 l Medium (0.8% Stärke; 0.2% Glucose; 0.2% Sojamehl; 0.2% Hefeextrakt; 0.1% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.1% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7.4) gefüllt. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 upm, 30°C). Fermentiert wird bei 32°C mit

einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0.2 NL pro m³ Reaktorvolumen und Std., der pH-Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7.4 gehalten. Die Fermentation dauert 7–10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Überstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z. B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2–5%) fermentiert werden.

5

Isolierung von Epothilon A und B

Während der Fermentation von *Sorangium cellulosum* So ce90 (z. B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z. B.: XAD-1180, Röhm und Haas, 2% v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A und B vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrühe (z. B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingeeengt und dreimal mit je 0,2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingeeengt (ca. 40 g Trockengewicht).

10

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep® RP-18 25–40 µm (Säule: 400 × 100 mm; Fluß: 200 ml/min;) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen (R_t ca. 95–125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 × 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min; R_t Epothilon A: 140–165 min; R_t Epothilon B: 170–195 min).

15

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

20

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2

2. Epothilon B: Ethylacetat

Epothilon A

25

C₂₆H₃₉NO₆S[493]

FAB-MS (neg. Ionen): 429.25 für (M-H)⁻

¹H-NMR-Daten s. Tab. 1

30

¹³C-NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm⁻¹

DC: R_F = 0,75

35

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

40

HPLC: R_t = 5,4 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb® RP-18 7 µm;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

45

Epothilon B

C₂₇H₄₁NO₆S[507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M-H)⁻

¹H-NMR-Daten s. Tab. 1

50

¹³C-NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm⁻¹

DC: R_F = 0,75

55

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

60

HPLC: R_t = 6,3 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb® RP-18 7 µm;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

65

Tabelle 1

¹H – NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A	B
2a	2,4 dd	2,22 dd
2b	2,52 dd	2,53 dd
3	4,19 dd	4,24 dd
6	3,2 m	3,28 m
7	3,78 dd	3,75 dd
8	1,73 m	1,73 m
9a	1,4 m	1,4 m
9b	1,52 m	1,5 m
10a	1,4 m	1,4 m
10b	1,4 m	1,4 m
11a	1,42 m	1,42 m
11b	1,7 m	1,7 m
12	2,9 ddd	—
13	3,01 ddd	2,8 dd
14a	1,85 ddd	1,9 ddd
14b	2,11 ddd	2,1 ddd
15	5,41 dd	5,41 dd
17	6,6 s	6,6 s
19	6,99 s	6,99 s
21*)	1,08 s	1,05 s
22*)	1,35 s	1,36 s
23	1,15 d	1,15 d
24	0,93 d	0,92 d
25	2,05 s	2,05 s
26	2,69 s	2,69 s
27	—	1,28 s

*) Zuordnung vertauschbar

Tabelle 2

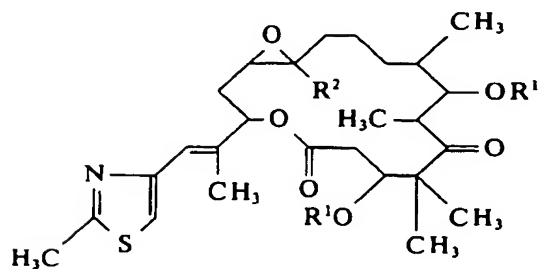
¹³C-NMR-Daten der Epothilone A und B

Atom	A	B
1	170,5	170,5
2	39,1	39,4
3	73,2	72,9
4	53,0	53,2
5	219,9	219,8
6	43,5	43,1
7	74,7	74,3
8	36,4	36,6
9	30,7	30,9
10	23,6	22,5
11	27,6	32,3
12	57,4	61,3
13	54,6	61,7
14	31,7	32,4
15	76,8	76,9
16	137,4	137,5
17	120,1	120,0
18	152,1	152,1
19	116,3	116,2
20	165,0	165,1
21*)	20,4	19,7
22*)	21,6	21,5
23	14,1	13,7
24	17,1	17,1
25	15,6	15,7
26	19,1	19,0
27	—	22,7

*) Zuordnung vertauschbar

Patentansprüche

1. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R¹ Wasserstoff, C₁- bis C₄-Alkyl, C₁- bis C₄-Acyl, Li⁺, K⁺, Na⁺, 1/2 Mg²⁺ oder 1/2 Ca²⁺ bedeutet und R² Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

2. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

	¹ H-NMR-Daten		¹³ C-NMR-Daten	
	Atom		Atom	
5	2a	2,4	1	170,5
	2b	2,52	2	39,1
	3	4,19	3	73,2
	6	3,2	4	53,0
	7	3,78	5	219,9
10	8	1,73	6	43,5
	9a	1,4	7	74,7
	9b	1,52	8	36,4
	10a	1,4	9	30,7
	10b	1,4	10	23,6
15	11a	1,42	11	27,6
	11b	1,7	12	57,4
	12	2,9	13	54,6
	13	3,01	14	31,7
	14a	1,85	15	76,8
20	14b	2,11	16	137,4
	15	5,41	17	120,1
	17	6,6	18	152,1
	19	6,99	19	116,3
	21*)	1,08	20	165,0
25	22*)	1,35	21*)	20,4
	23	1,15	22*)	21,6
	24	0,93	23	14,1
	25	2,05	24	17,1
	26	2,69	25	15,6
30			26	19,1

*) Zuordnung vertauschbar,

C26H39NO6S[493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für (M-H)⁻

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm⁻¹

DC: R_F = 0,75

DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 5,4 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb® RP-18 7 µm;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

3. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

¹ H—NMR-Daten		¹³ C—NMR-Daten		
Atom		Atom		
2a	2,22 dd	1	170,5	5
2b	2,53 dd	2	39,4	
3	4,24 dd	3	72,9	
6	3,28 m	4	53,2	
7	3,75 dd	5	219,8	
8	1,73 m	6	43,1	10
9a	1,4 m	7	74,3	
9b	1,5 m	8	36,6	
10a	1,4 m	9	30,9	
10b	1,4 m	10	22,5	
11a	1,42 m	11	32,3	15
11b	1,7 m	12	61,3	
12	—	13	61,7	
13	2,8 dd	14	32,4	
14a	1,9 ddd	15	76,9	
14b	2,1 ddd	16	137,5	20
15	5,41 dd	17	120,0	
17	6,6 s	18	152,1	
19	6,99 s	19	116,2	
21*)	1,05 s	20	165,1	
22*)	1,36 s	21*)	19,7	25
23	1,15 d	22*)	21,5	
24	0,92 d	23	13,7	
25	2,05 s	24	17,1	
26	2,69 s	25	15,7	
27	1,28 s	26	19,0	30
		27	22,7	

(R¹ = CH₃)

*) Zuordnung vertauschbar

C₂₇H₄₁NO₆S[507]FAB-MS (neg. Ionen): 506,25 für (M-H)⁻UV (MeOH) λ_{max} (log ε) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:

ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm⁻¹DC: R_F = 0,75DC-Alufolie 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R_t = 6,3 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb® RP-18 7 μm;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

4. Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Stamm So ce90

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und

- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

5. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie Fungizide oder Fungistatika sind.

7. Therapeutische Mittel, die insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppres-

sion bewirken können, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder diese Epothilone enthaltend, neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65